

Table 8 - 1 Organ weight - Group mean values in female rats
Absolute weight at terminal kill after 14 days of treatment

Dose (mg/kg/day)	Body							
	weight (g)	Brain (mg)	Thymus (mg)	Spleen (mg)	Liver (g)	Kidneys (mg)	Adrenals (mg)	
0	Mean	202	1768	357	468	7.21	1429	78.3
	S.D.	9	31	70	52	0.82	145	5.3
	N	10	10	10	10	10	10	10
Paration 0.25 + MPMC 30	Mean	198	1784	366	430	7.19	1375	81.2
	S.D.	9	46	68	45	0.69	99	7.3
	N	10	10	10	10	10	10	10
Paration 0.5	Mean	204	1766	406	482	7.40	1387	79.1
	S.D.	7	54	65	75	0.70	128	11.4
	N	10	10	10	10	10	10	10
MPMC 60	Mean	196	1734	315	408 *	6.79	1415	92.3 **
	S.D.	10	68	79	55	0.43	98	10.8
	N	10	10	10	10	10	10	10

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$

Table 8 - 2 Organ weight - Group mean values in female rats
Relative weight to body weight(%) at terminal kill after 14 days of treatment

Dose (mg/kg/day)		Brain	Thymus	Spleen	Liver	Kidneys	Adrenals
0	Mean	0.878	0.177	0.232	3.56	0.707	0.0388
	S.D.	0.042	0.033	0.025	0.27	0.056	0.0030
	N	10	10	10	10	10	10
Paration 0.25 + MPMC 30	Mean	0.902	0.184	0.217	3.62	0.693	0.0410
	S.D.	0.052	0.033	0.018	0.21	0.033	0.0041
	N	10	10	10	10	10	10
Paration 0.5	Mean	0.865	0.199	0.236	3.62	0.678	0.0388
	S.D.	0.021	0.031	0.032	0.26	0.046	0.0060
	N	10	10	10	10	10	10
MPMC 60	Mean	0.887	0.161	0.208 *	3.47	0.723	0.0472 **
	S.D.	0.050	0.040	0.023	0.13	0.051	0.0049
	N	10	10	10	10	10	10

Relative weight= (organ weight/body weight x 1000) x 100

S.D.: Standard deviation.

N: Number of animals examined.

Significantly different from control: *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

食品中化学物質の複合影響に及ぼす代謝活性化に関する研究

分担研究者 出川 雅邦 静岡県立大学 薬学部教授

協力研究者 関本 征史 静岡県立大学 薬学部助教

研究要旨

本研究では、食品中に含まれる化学物質の複合曝露による CYP1A サブファミリー酵素活性およびそれら酵素遺伝子の転写活性化（芳香族炭化水素受容体（AhR）の活性化）への影響について検討した。

シトクロム P450 発現に影響を与えることが知られる 4 種の食品添加物（クルクミン（CUR）、チアベンダゾール（TBZ）、ブチルヒドロキシトルエン（BHT）、没食子酸プロピル（PG））を被検化合物として、先ずそれぞれの AhR 活性化能および CYP1A 酵素活性化能を、我々が樹立した AhR リガンド検索用細胞株（ヒト肝癌細胞由来 HepG2-A10 およびラット肝細胞由来 KanR2-XL8）を用いて検討した。その結果、用いた化合物 4 種のうち TBZ にのみ AhR 活性化能が確認された。なお、TBZ をはじめ、用いたすべての化合物において CYP1A 酵素活性化能は認められなかった。また、各被検物質の複合曝露の AhR 活性化に及ぼす影響についても検討したが、有意な影響は見られなかった。

次に、代表的な AhR リガンドである 3-メチルコラントレン（MC）と各被検化合物の複合曝露による AhR 活性化および CYP1A 酵素活性への影響について検討した。その結果、MC+CUR 処理群においては、CUR の濃度に依存的に AhR 活性化の増強が観察された。また、MC+TBZ 処理群では、TBZ の濃度に依存的に AhR の活性化および CYP1A 酵素活性の増強が見られた。それらの増強はいずれも相乗的であった。なお、BHT や PG にはそのような効果は認められなかった。

以上、本研究で用いた 4 種の食品添加物（CUR、TBZ、BHT、PG）のうち、TBZ による AhR 活性化能を除いて、各化合物とも単独では AhR 活性化能や CYP1A 酵素活性化能を示さないが、TBZ と CUR には、MC による AhR 活性化および CYP1A 酵素活性誘導を増強する作用があることが明らかとなった。したがって、これら食品添加物は、環境中に含まれる AhR リガンドによる AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導を促進する可能性がある。今後、これら促進機構を明らかとするとともに、毒性発現への影響について検討する必要がある。

A. 研究目的

芳香族炭化水素受容体 (AhR; Aryl hydrocarbon receptor) は、ベンゾ[a]ピレンなどのがん原性芳香族炭化水素類の代謝活性化に関わるシトクロム P450IA (CYP1A) 酵素遺伝子の転写因子であること、また、ダイオキシン類による催奇形性にも関わっていることが知られている。

生活環境中から AhR リガンドや CYP1A 酵素誘導を引き起こす化合物が種々発見されており、発がんや内分泌かく乱との関連性が懸念されている。一方、食品中に含まれる化学物質の CYP1A 酵素誘導能については、主に単独作用についていくつか報告されているものの、その複合曝露についての報告はほとんど無い。

本研究では、AhR リガンド物質の検索用細胞株として樹立したヒト肝癌細胞由来 HepG2-A10 およびラット肝細胞由来 KanR2-XL8 細胞を用いて、肝薬物代謝酵素を誘導することが知られている4種の食品添加物、クルクミン (CUR)、チアベンダゾール (TBZ)、ブチルヒドロキシトルエン (BHT) および没食子酸プロピル (PG) を被検体として、それらの AhR 活性化や CYP1A 誘導に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

1) 試験細胞株

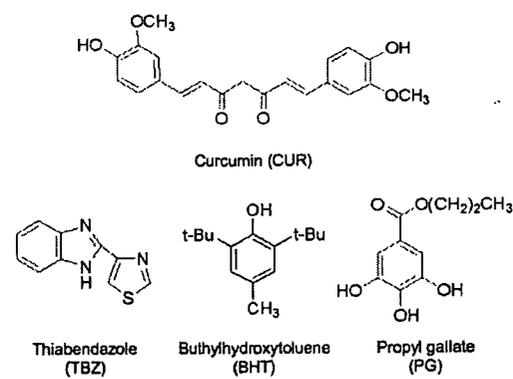
ヒト肝がん細胞株 HepG2 およびラット肝由来細胞株 Kan-R2 に、ラット CYP1A1 遺伝子のプロモーター領域にある AhR 結合配列 (XRE) の3回繰り返し配列を組み込んだルシフェラーゼプラスミドを導入し、その後、導入遺伝子を安定発現するクロー

ン HepG2-A10 および KanR2-XL8 を選択、樹立し、試験細胞株として用いた。

2) 被検化合物

本研究で使用した化合物の構造を図1に示す。CUR は生薬試験用標準品 (純度 99%) を和光純薬より購入し使用した。TBZ は純度 98% (Sigma)、BHT は純度 99% (Sigma)、PG は純度 98% (Fluka) のものをそれぞれ購入し、使用した。また、MC については、98%純度品 (Aldrich) を使用した。各化合物はいずれもジメチルスルホキシド (DMSO) に溶解して使用した。

A) 被検化合物



B) AhRリガンド

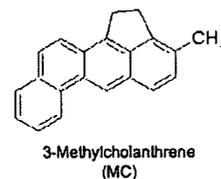


図1 本研究で使用した化合物

3) 細胞増殖に及ぼす影響

HepG2-A10あるいはKanR2-XL8細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように96穴プレートに播種し、48時間前培養した。前培養後、被検化合物を添加し、さらに48時間培養した。培養後、細胞を洗浄し、Alamar Blue 試薬 (Biosource INTERNATIONAL) を含んだ無

血清培地にて 2 時間培養した。その後、生細胞由来の蛍光代謝物による蛍光を測定し、生存細胞数を定量化した。さらに、溶媒対照群を 100 とした場合の相対値を算出し、プロビット法により細胞死に対する EC₅₀ を算出した。

4) AhR 活性化能の測定

HepG2-A10 あるいは KanR2-XL8 細胞を 2×10^4 cell/cm² となるように 24 穴プレートに播種し、48 時間前培養した。前培養後、被検物質を添加し、24 時間培養した。その後、Reporter Lysis Buffer (Promega) を用いて細胞を溶解した。この細胞溶解液にルシフェラーゼ基質液 (東洋インキ) を添加し、生じた発光をルミネッセンサー PSN (ATTO) により測定した。また、BCA-protein assay kit (PIERCE) を用いて細胞溶解液中のタンパク濃度を測定し、タンパクあたりの発光強度を算出した。

5) CYP1A 酵素アッセイ

CYP1A 酵素の代表的な基質として知られるエトキシレゾルフィン (ER) を用い、その脱エチル化活性 (EROD 活性) を指標として、CYP1A 酵素活性を測定した。なお、KanR2-XL8 細胞の恒常的 CYP1A 酵素活性は著しく弱いため、ここでは HepG2-A10 細胞のみを使用した。

前項 4) の方法に準じて HepG2-A10 細胞を前培養し、被検物質を処理した。培養後、細胞を洗浄し、さらに ER を含んだ無血清培地にて 30 分間培養した。その後、上清を回収し、生じた蛍光代謝物による蛍光を測定した。また、1N NaOH を用いて細胞を

溶解し、この細胞溶解液中のタンパク濃度を BCA-protein assay kit (PIERCE) を用いて測定して、タンパクあたりの酵素活性を算出した。

(倫理面への配慮)

申請者ならびに研究協力者の健康保持のため、本研究で被検物質として使用する化合物、各実験で使用する薬品は、安全キャビネット等で厳重に注意して取り扱った。

C. 研究結果

1) 被検化合物の細胞増殖に与える影響

KanR2-XL8 および HepG2-A10 の細胞増殖に対する各被検化合物の影響を、Alamar Blue Assay により検討した。

CUR には用いた両細胞に対し強い細胞増殖阻害性が見られた。また同様に、BHT にも弱いながら細胞増殖阻害活性が見られた (表 1)。

表 1 被検化合物の単独曝露による細胞増殖阻害活性 (EC₅₀ 値)

	HepG2-A10	KanR2-XL8
CUR	9.9 μM	12.8 μM
TBZ	348.3 μM	> 500.0 μM
BHT	66.4 μM	56.9 μM
PG	158.4 μM	131.0 μM

2) 被検化合物の単独曝露が AhR 活性化および CYP1A 酵素活性に及ぼす影響

各被検化合物を単独で処理した場合の AhR 活性化および CYP1A 酵素活性に及ぼす影響について、HepG2-A10 細胞および KanR2-XL8 細胞を用いて検討した。

その結果、TBZ (10 μ M、100 μ M) 処理群では、有意な AhR の活性化が認められたが (図 2A)、CUR、BHT あるいは PG 処理群では、いずれの細胞株においても AhR の活性化は認められなかった。

また、いずれの被検化合物の処理によっても、CYP1A 酵素活性の有意な増加は観察されなかった (図 2B)。

3) 被検化合物の複合曝露が AhR 活性化に及ぼす影響

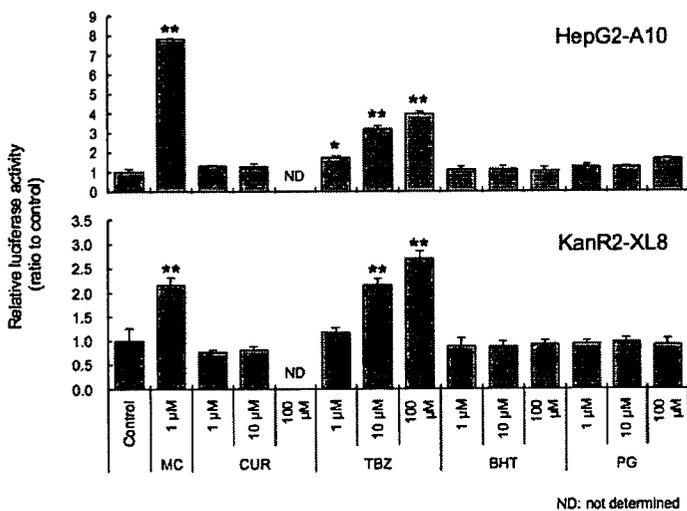
4 種の被検化合物のうち 2 種を組み合わせた場合の AhR 活性化に及ぼす影響について HepG2-A10 細胞を用いて検討した。

その結果、TBZ と他の被検化合物のそれぞれ複合曝露群において、TBZ 単独処理群と同程度の AhR 活性化が認められたに過ぎず、他の組み合わせ処理による有意な AhR の活性化は認められなかった (図 3)。

4) AhR リガンド MC と被検化合物との複合曝露による AhR 活性化および CYP1A 酵素活性に及ぼす影響

環境中にはダイオキシン類や芳香族炭化水素類など、様々な AhR リガンドが存在しており、これら AhR リガンドと食品添加物の相互作用の有無についても興味を持たれる。そこで、AhR リガンドである MC に

(A) AhR activation



(B) CYP1A enzyme activity

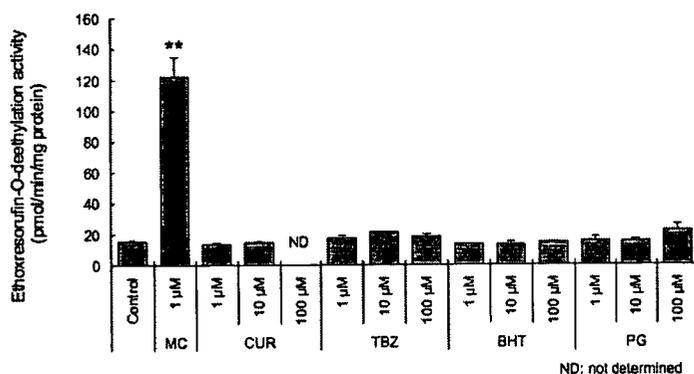


図 2 被検化合物の単独処理による AhR 活性化および CYP1A 酵素誘導への影響

HepG2-A10 および KanR2-XL8 細胞を 2×10^4 cell/cm² の割合で 24 穴プレートに播種し、48 時間前培養した。さらに、各被検化合物 (1, 10, 100 μ M) を添加して 24 時間培養した。対照群 (Control) には、溶媒である DMSO を最終濃度 0.2% となるように添加した。

(A) 培養後、細胞溶解液を調製し、AhR 活性化をルシフェラーゼアッセイにより測定した。グラフは、各処理群における対照群に対する比の平均および標準偏差を表した (n=3)。

(B) 培養後、EROD 活性を指標として CYP1A 酵素活性を測定した。グラフは、各処理群における酵素活性の平均および標準偏差で表した (n=3)。

対照群に対する有意差は、Dunnet's test により検定した (* p <0.05, ** p <0.01)。

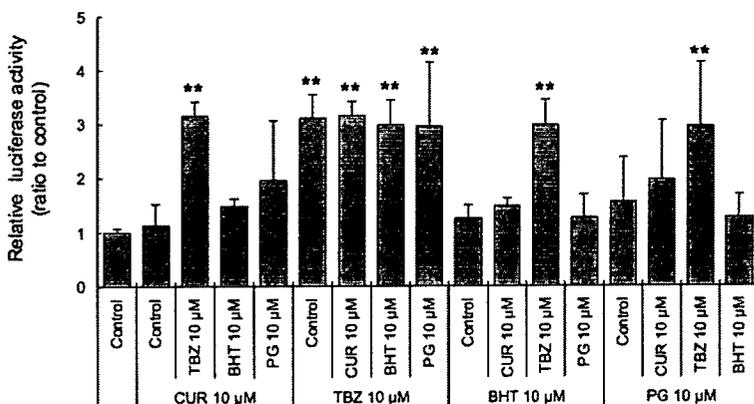


図3 被検化合物の複合処理による AhR 活性化への影響

図2と同様に、HepG2-A10細胞を前培養した後、2種の被検化合物をそれぞれ10 μMとなるように同時に加え24時間培養した。

培養後、細胞溶解液を調製し、ルシフェラーゼ活性を測定した。

グラフは、各処理群における対照群に対する比の平均および標準偏差で表した(n=3)。対照群に対する有意差は、Dunnet's testにより検定した(*p<0.05, **p<0.01)。

よって惹起される AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導に及ぼす被検化合物の影響について検討した。

MCとCURあるいはTBZの複合処理により、MC単独処理時に比べて有意な AhR 活性化増強が認められた(図4A)。一方、BHTやPGの複合処理による影響は認められなかった(図4A)。

CYP1A 酵素活性についても、弱いながら CUR あるいは TBZ と MC による複合処理効果が認められた(図4B)。

5) AhR 活性化および CYP1A 酵素誘導における CUR および TBZ の濃度依存性についての検討

前項4)において、MCによる AhR 活性化および CYP1A 酵素活性化(誘導)を増強した CUR および TBZ について、その濃度依存性を検討した。

図5には CUR 処理群についての結果を示した。AhR 活性化および CYP1A 酵素誘導は CUR 単独処理群では認められなかったが、0.1 μM MC の存在下では、最大濃度(10 μM)

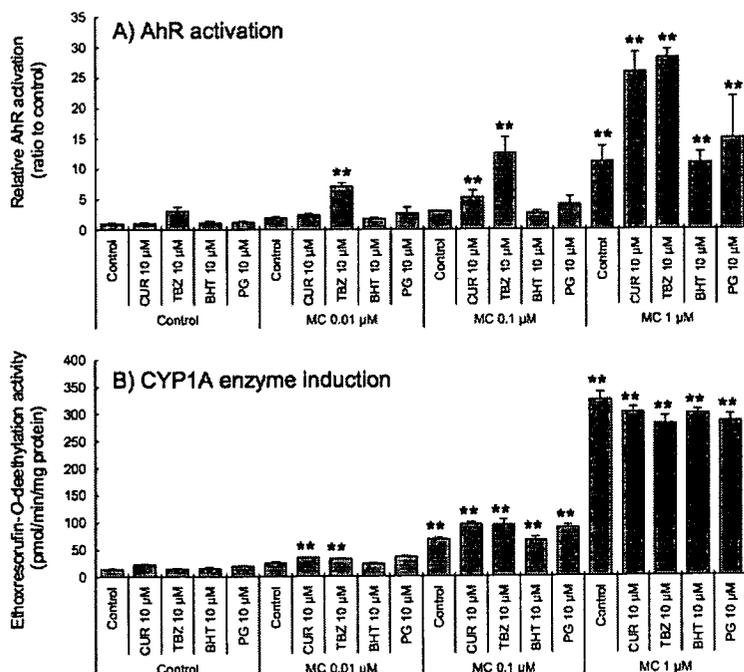


図4 AhR リガンド MC と被検化合物との複合処理による AhR 活性化および CYP1A 酵素誘導への影響

図2と同様に、HepG2-A10細胞を前培養した後、AhR 活性化剤である MC(0-1 μM)と各被検化合物(10 μM)を同時に添加して24時間培養した。

(A)培養後、細胞溶解液を調製し、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。(B)培養後、EROD 活性を指標として CYP1A 酵素活性を測定した。

グラフは、各処理群における酵素活性の平均および標準偏差で表した(n=3)

いずれも、対照群に対する有意差の有無を Dunnet's test により検定した(*p<0.05, **p<0.01)。

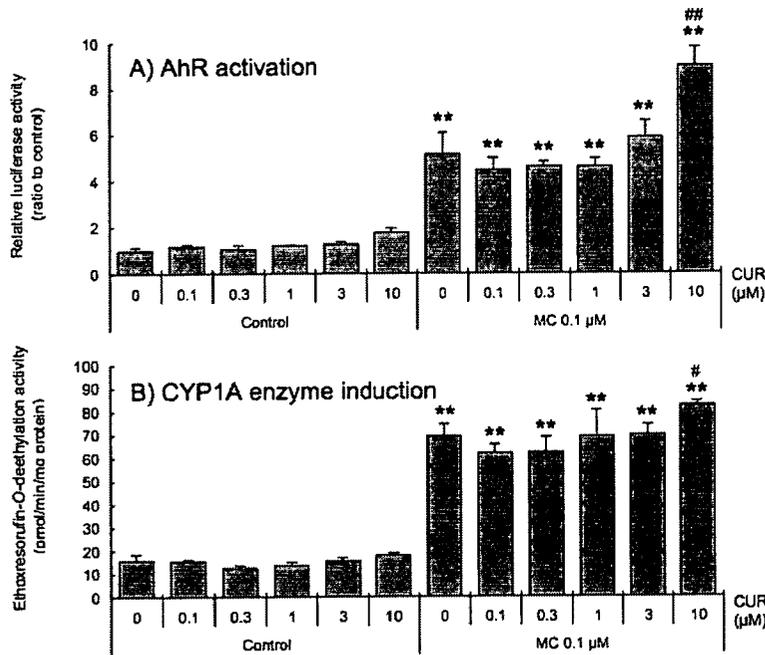


図5 CUR濃度依存的なAhR活性化およびCYP1A酵素誘導

図2と同様に、HepG2-A10細胞を前培養した後、AhR活性化剤であるMC(0.1 μM)とCUR(0-10 μM)を同時に添加して24時間培養した。

(A)培養後、細胞溶解液を調製し、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。(B)培養後、EROD活性を指標としてCYP1A酵素活性を測定した。

グラフは、各処理群における酵素活性の平均および標準偏差で表した(n=3)。対照群と実験群の有意差はDunnet's testにより検定した(*p<0.05, **p<0.01)。また、同様に、0.1 μM MC単独処理群との有意差についても検定した(#p<0.05, ##p<0.01)。

のCUR処理により有意なAhR活性化およびCYP1A酵素活性の上昇が観察された。

図6にはTBZ処理群についての結果を示した。TBZは単独高濃度(200 μM)において有意にAhR活性化を引き起こしたが、その程度は0.1 μM MC処理群と同程度であ

った。MC(0.1 μM)との複合処理では、TBZの濃度に依存的なAhR活性化増強が認められた(図6A)。AhR活性化と同様、CYP1A酵素活性についてもTBZ単独処理群ではほとんど上昇が認められなかったのに対し、MCの存在下では、TBZの濃度に依存的し

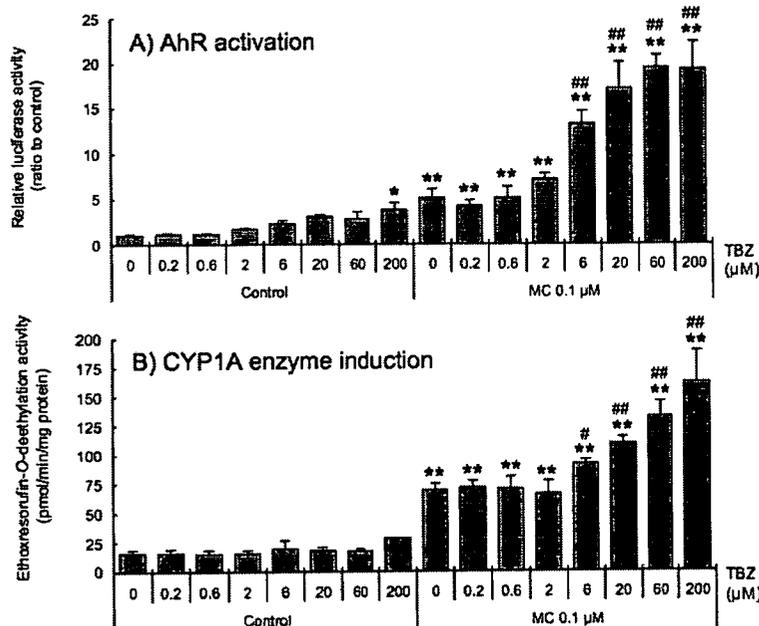


図6 TBZ濃度依存的なAhR活性化およびCYP1A酵素誘導

図2と同様に、HepG2-A10細胞を前培養した後、AhR活性化剤であるMC(0.1 μM)とTBZ(0-200 μM)を同時に添加して24時間培養した。

(A)培養後、細胞溶解液を調製し、ルシフェラーゼアッセイにより測定した。(B)培養後、EROD活性を指標としてCYP1A酵素活性を測定した。

グラフは、各処理群における酵素活性の平均および標準偏差で表した(n=3)。対照群と実験群の有意差はDunnet's testにより検定した(*p<0.05, **p<0.01)。また、同様に、0.1 μM MC単独処理群との有意差についても検定した(#p<0.05, ##p<0.01)。

た活性の上昇が観察された(図 6B)。また、MC 共存下における AhR 活性化および CYP1A 活性の増強はいずれも低濃度 (6 μ M) の TBZ 処理により惹起されることも確認された。

D. 考察

本研究では、食品添加物であり、かつ肝 CYP 分子種の発現変動を引き起こす事が知られている CUR、TBZ、BHT および PG を用いて、AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導に及ぼす影響を検討した。その結果、用いた被検化合物のうち、TBZ にのみ単独で AhR 活性化作用があることや、MC との複合処理により CUR や TBZ が MC の AhR 活性化ならびに CYP1A 酵素活性の誘導を増強することを明らかとした。

以下に、化合物ごとに考察する。

1) CUR について

ヒト肝癌細胞由来の HepG2-A10 およびラット肝細胞由来の KanR2-XL8 細胞を用いた本研究結果より、CUR が AhR リガンド様作用を示す可能性は低いものと考えられる。CUR は雌マウス肝では CYP1A 誘導性を示さないことが報告されており、本研究結果はこれと一致した。一方、CUR はヒト初代肝細胞やがん細胞株において AhR 依存的に CYP1A1 遺伝子の発現を増加させることが報告されている。したがって、細胞の種類や動物種間、あるいは培養条件の違いなどにより CUR の CYP1A 酵素誘導性や AhR 活性化能が異なる可能性がある。

MC との複合曝露の結果からは、CUR は AhR リガンドによる AhR 活性化を間接的

に増強している可能性が示唆された。これまでに、CUR は TCDD による CYP1A 酵素誘導を阻害することや、AhR 活性化を阻害することが示されており、本研究の結果とは一致しない。これらの相違は用いた細胞の種類や培養条件の違いによって生じたものと考えられる。

2) TBZ について

TBZ の単独処理により AhR は活性化されたものの、CYP1A 酵素活性の上昇は見られなかった。TBZ はオメプラゾール (OME) に類似した構造を持つベンズイミダゾール誘導体であり、AhR には直接結合することなく間接的に AhR を活性化し、CYP1A 遺伝子の発現を誘導する事が知られている。また、HepG2 細胞においては、TBZ 処理による CYP1A 酵素誘導は mRNA レベル、蛋白レベルでのみ認められるという報告があり、本実験結果はこれらと一致した。

一方、MC との複合曝露の結果から、TBZ は AhR リガンドによる AhR 活性化および CYP1A 酵素活性化を増強することを見出した。したがって、TBZ あるいは OME などのベンズイミダゾール誘導体には、環境中に含まれる AhR リガンドによる AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導を促進する可能性が考えられる。TBZ や OME と AhR リガンドによる相乗的な CYP1A 酵素誘導や、相乗的な AhR 活性化についての報告は見当たらず、*in vivo* レベルでの相乗作用の有無、あるいは相乗作用に伴った毒性発現などについても更なる検討が必要である。

3) BHT および PG について

BHT や PG は HepG2-A10 および KanR2-XL8 に対して、AhR 活性化能や CYP1A 酵素誘導能がないことが明らかになった。

BHT にはマウス肝において弱い CYP1A 酵素誘導作用があるとの報告があるが、*in vitro* 培養細胞における誘導性については報告されていない。また、ニトロアニソール類やイソサフロールなど、比較的分子量の小さな CYP1A 酵素誘導剤は *in vivo* 特異的な誘導作用を示すことが明らかとなっており、BHT も *in vivo* 特異的な CYP1A 酵素誘導剤である可能性が考えられた。

PG については、CYP1A 酵素に対する阻害作用がこれまでに報告されている。本研究の予備試験においても、PG がエトキシレゾルフィンの脱 O-アルキル化反応を阻害することを見いだしており、これまでの報告を支持するものと思われた。

E. 結論

本研究により、食品添加物として繁用されている TBZ や CUR が AhR 活性化や CYP1A 酵素活性上昇（誘導）に影響を及ぼす可能性が示唆された。特筆すべきは、これら化合物は MC と複合曝露されることで AhR 活性化や CYP1A 酵素活性誘導において相乗的な誘導作用を示すことを見いだしたことである。

これまで、AhR 活性化や CYP1A 酵素活性誘導にける複合影響についての報告例はほとんどなく、本研究結果は AhR 活性化や CYP1A 酵素誘導を介した毒性発現を考える上で重要であると思われた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願

なし

分担研究報告書

食品中化学物質の複合影響による反応生成物に関する研究

分担研究者	中澤 裕之	星薬科大学	薬品分析化学教室
研究協力者	斉藤 貢一	星薬科大学	薬品分析化学教室
	伊藤 里恵	星薬科大学	薬品分析化学教室
	岩崎 雄介	星薬科大学	薬品分析化学教室
	大柄 敦資	星薬科大学	薬品分析化学教室

研究要旨

近年、食品中に含有されるフェノール性化合物の抗酸化能が注目されており、健康食品などにフェノール性化合物が幅広く使用されている。しかし、種々のフェノール性化合物は、金属との反応によって活性酸素種 (ROS) を生成し、DNA の損傷や脂質の過酸化を引き起こすことが報告されている。一方、炎症性疾患等において生体内で生成される一酸化窒素やペルオキシナイトライトなどの活性窒素種 (RNS) は、芳香族アミノ酸などの生体分子のニトロ化を引き起こすことから、これらの疾患時において摂取されたフェノール性化合物も、ニトロ化されることが考えられる。本研究では、タバコ煙やコーヒー中に含まれるカテコール (CAT)、コーヒーに高濃度で含有されるカフェイン酸 (CFA) について、ニトロ化によるラジカル消去能及び発生能の変化を検討した。

A. 研究目的

近年、茶葉に含まれるカテキン類に代表されるフェノール性化合物は抗酸化作用を有することから注目されている。一方で、活性酸素種 (ROS) は動脈硬化、心疾患、老化や発がんといった種々の疾病に関与していることが明らかとなっており、ROS を消去する抗酸化物質の摂取はこれら疾病の予防につながると考えられている。しかし、フェノール性化合物と金属が反応することで ROS が発生することが報告¹⁾されている。これらのことより、抗酸化物質の安全性についてさらに詳細な研究が要求されている。

他方、炎症性疾患等において生体内で生成する一酸化窒素やペルオキシナイトライトなどの活性窒素種 (RNS) は、芳香族アミノ酸などの生体分子のニトロ化を惹起することか

ら、これらの疾患時において摂取されたフェノール性化合物も、ニトロ化されることが考えられる。

本研究では、タバコ煙やコーヒー中に含まれるカテコール (CAT)、コーヒーに高濃度で含有されるカフェイン酸 (CFA) について、ニトロ化によるラジカル消去能及び発生能の変化について検討した。

B. 研究方法

B-1. ニトロカテコール (NO₂-CAT) が活性酸素種発生に与える影響

B-1-1. ラジカル消去作用の評価

CATおよびNO₂-CATの抗酸化能を評価するために、塩基性条件下において過酸化水素を添加することで、発生するヒドロキシラジカルとCATおよびNO₂-CATを反応させた。ROS

発生量の評価には、蛍光プローブである

2,7-dichlorodihydrofluorescein diacetate

(DCFH-DA) を用いて励起波長485 nm、蛍光波長523 nm で蛍光強度を測定した²⁾。

B-1-2. ラジカル発生作用の評価

CAT および NO₂-CAT の ROS 発生能の評価を行うために、フェノール性化合物と高い反応性を示す銅と反応させ、DCFH-DA を用いて蛍光強度を測定した。

B-2. ニトロカフェイン酸 (NO₂-CFA) が活性酸素種発生に与える影響

B-2-1. NO₂-CFA の合成

NO₂-CFA の標準品を得るためにカフェイン酸 (CFA) と硝酸を酢酸酸性条件化で反応を行った。得られた化合物は高速液体クロマトグラフィー/質量分析法 (LC/MS) および核磁気共鳴法 (NMR) によって解析を行なった。

B-2-2. ラジカル消去作用の評価

CFA および NO₂-CFA の抗酸化能を評価するために、CAT と同様の方法で測定した。ROS 発生量の評価には、蛍光プローブである DCFH-DA を用い、励起波長485 nm、蛍光波長523 nm に設定し蛍光強度を測定した。

B-2-3. ラジカル発生作用の評価

CFA および NO₂-CFA の ROS 発生能の評価を行うために、CAT と同様に銅と反応させ、DCFH-DA を用いてその蛍光強度を測定した。また、電子スピン共鳴法 (ESR) により、発生する ROS の定性を行った。

C 研究結果

C-1. ニトロカテコール (NO₂-CAT) が活性酸素種発生に与える影響

Fig. 1 に示すように NO₂-CAT は CAT と同様に抗酸化作用が見られた。しかし、ラジカル発生作用については、NO₂-CAT の方が ROS の発生量が有意に増大する結果が得られた

(Fig. 2)。

C-2. ニトロカフェイン酸 (NO₂-CFA) が活性酸素種発生に与える影響

C-2-1. NO₂-CFA の合成

酢酸酸性条件下で硝酸と反応させ、得られた化合物を LC/MS で測定を行ったところ、ネガティブイオンモードで分子量関連イオンのピークである *m/z* 224 を確認することができた。また、NMR による構造解析の結果、カフェイン酸の2位がニトロ化された NO₂-CFA を確認した (Fig. 3)。

C-2-2. 抗酸化作用の評価

CFA および NO₂-CFA の抗酸化能を評価するために、CAT と同様にヒドロキシラジカルと CFA および NO₂-CFA をそれぞれ反応させた。その結果、それぞれの化合物について DCFH-DA の蛍光強度が減少したことにより、ニトロ化によって抗酸化作用は変化しないことを確認した (Fig. 4)。

C-2-3. ラジカル発生作用の評価

CFA および NO₂-CFA の ROS 発生能の評価を行うために、フェノール性化合物と高い反応性を示す銅と反応させ、DCFH-DA を用いてその蛍光強度を測定した。Fig. 5 に示すように、銅と反応させることで、ROS の発生量がニトロ化によって有意に増大した。また、抗酸化物質であるアスコルビン酸、マンニトールを添加することで、ROS の発生量は減少した。さらに、Fig. 6 に示すように ESR でもヒドロキシラジカルの増加が確認された。これらの結果より、ニトロ化によって ROS 発生量の増加が認められた。

D. 結論

本研究では、食品中に含まれるフェノール性抗酸化物質である CAT および CFA と NaNO₂ の併用投与によるニトロ化反応による ROS 発生量に及ぼす影響の解明を行った。

ROS 生成は、種々の発がん機構に関与することが知られていることから、生体内で摂取されたフェノール性化合物と NaNO_2 の併用投与によって ROS 生成の増加が起これ、さまざまな疾患へとつながることが考えられる。

抗酸化作用の評価ではニトロ化された物質においても同様の抗酸化作用が認められた。しかし、ラジカル発生作用はニトロ化を受けたことにより、ROS の発生量に大きな変化が認められた。

本研究で明らかとなったニトロ化反応によるラジカル発生作用の増強は極めて重要な知見であり、抗酸化物質の安全性についてさらに研究を進めていく必要がある。

E. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 大柄敦資、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之. カテコールのニトロ化と活性酸素種生成. 第 20 回 バイオメディカル分析科学シンポジウム (BMAS 2007) (2007 年 7 月・東京)
- 2) Atsushi Ogara, Yusuke Iwasaki, Yuji Ishii, Rie Ito, Koichi Saito, Akiyoshi Nishikawa and Hiroyuki Nakazawa. Effect of the nitration on generation of the reactive oxygen species for caffeic acid. 59th Pittsburgh Conference on Analytical Chemistry and Applied Spectroscopy (2008 年 2 月・アメリカ)
- 3) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之. フェノール性化合物の Prooxidant 作用に対するニトロ化反応の影響. フィジカル・ファーマフォーラム 2008 (2008 年 3 月・東京)
- 4) 大柄敦資、坂本泰洋、岩崎雄介、石井雄二、伊藤里恵、斉藤貢一、西川秋佳、中澤裕之. カフェイン酸による活性酸素種生成に及ぼすニトロ化の影響. 日本薬学会 第 128 年会 (2008 年 3 月・東京)

F. 参考文献

- 1) Li Y., Trush M.A.: Reactive oxygen-dependent DNA damage resulting from the oxidation of phenolic compounds by a copper-redox cycle mechanism. *Cancer Res.* 54(1994)1895-1898.
- 2) O'Malley Y.Q., Reszka K.J., Britigan B.E.: Direct oxidation of 2',7'-dichlorodihydrofluorescein by pyocyanin and other redox-active compounds independent of reactive oxygen species production. *Free Radic. Biol. Med.* 36(2004)90-100.

G. 知的財産権の出願・取得状況

なし

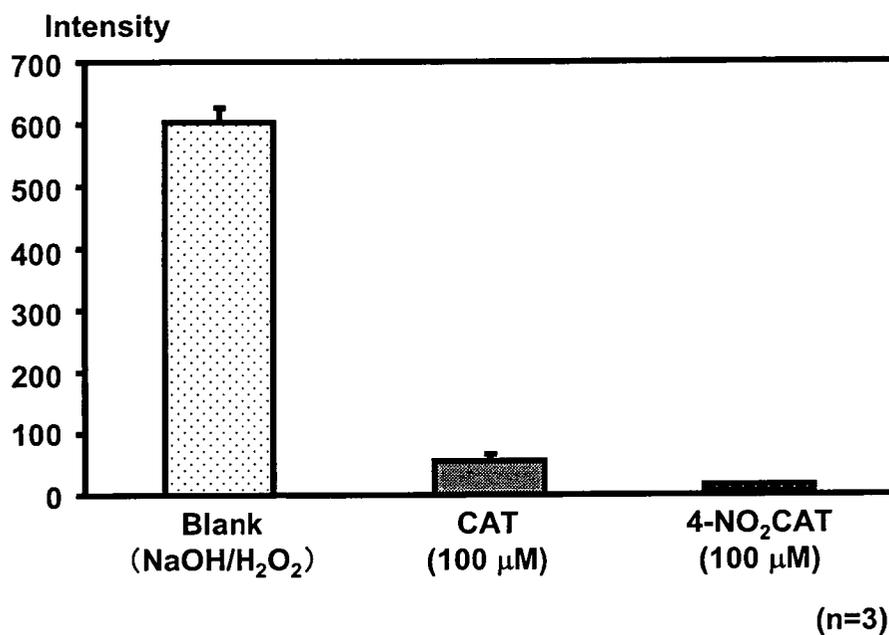


Fig. 1 Comparison of antioxidant ability between catechol and 4-nitrocatechol

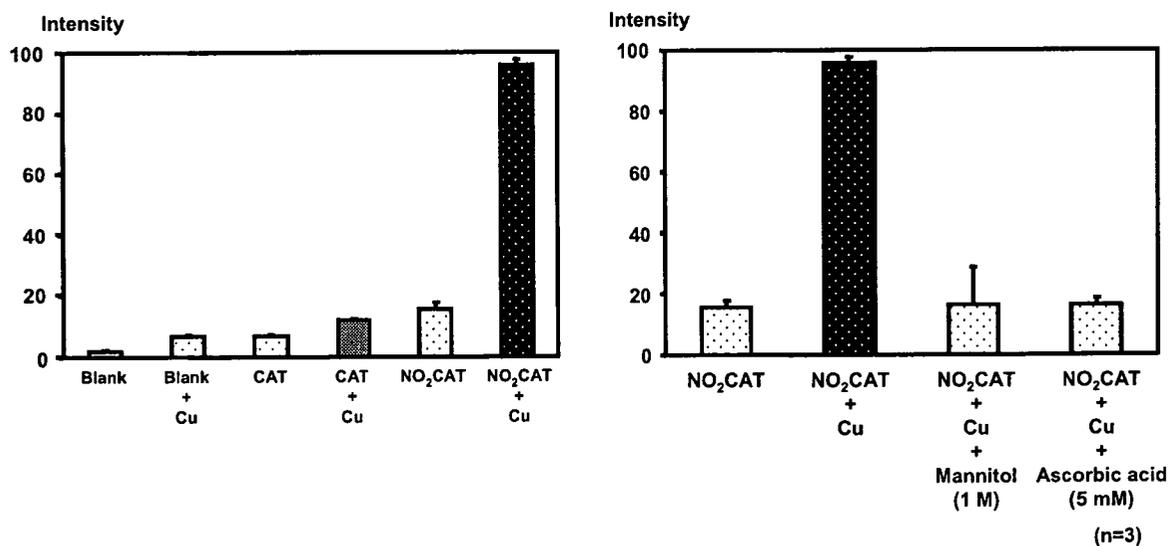


Fig. 2 Comparison of prooxidant ability between catechol and 4-nitrocatechol

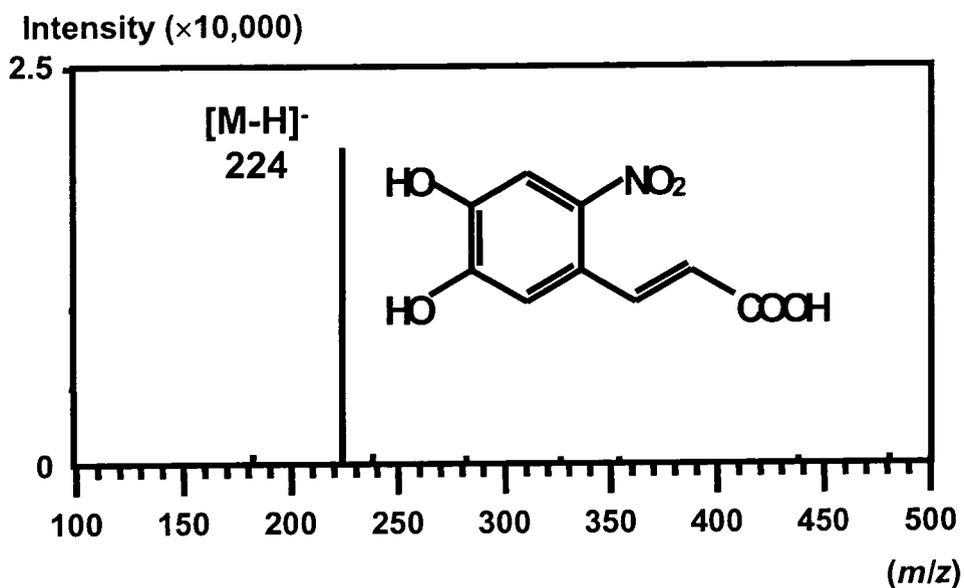


Fig. 3 Mass spectrum of 4,5-dihydroxy-2-nitro-cinnamic acid (2-nitro caffeic acid)

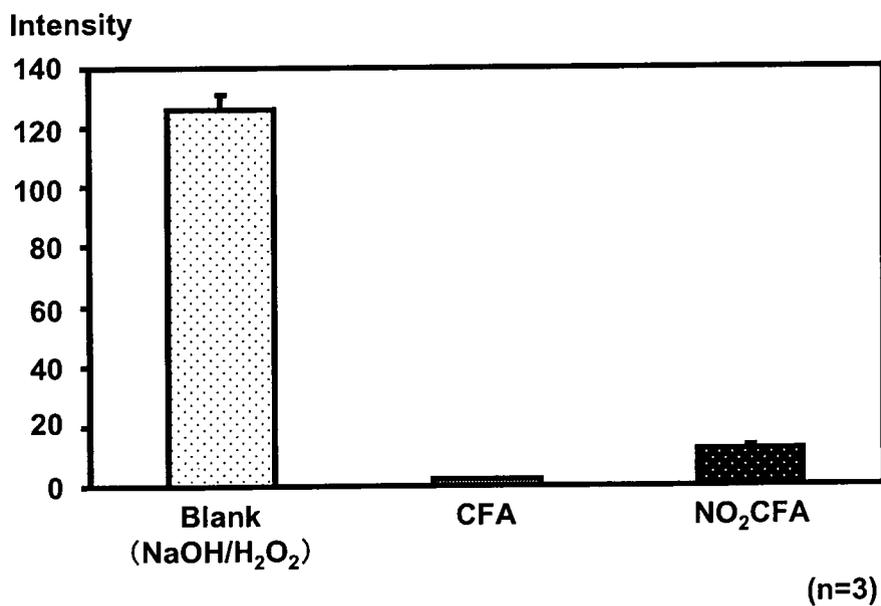


Fig. 4 Comparison of antioxidant ability between caffeic acid and 2-nitrocaffeic acid

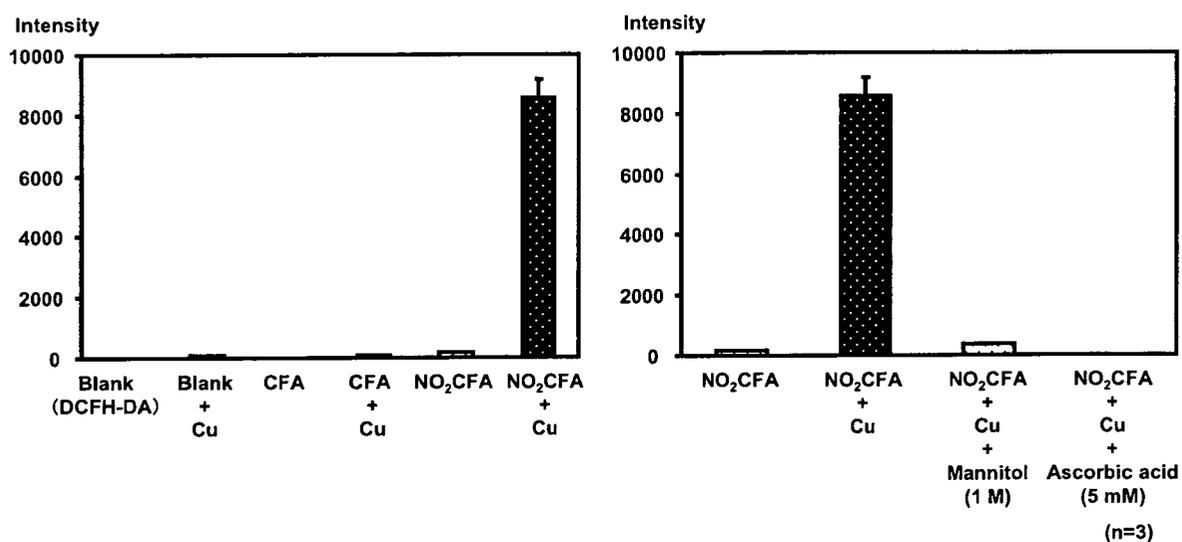


Fig. 5 Comparison of prooxidant ability between caffeic acid and 2-nitrocaffeic acid

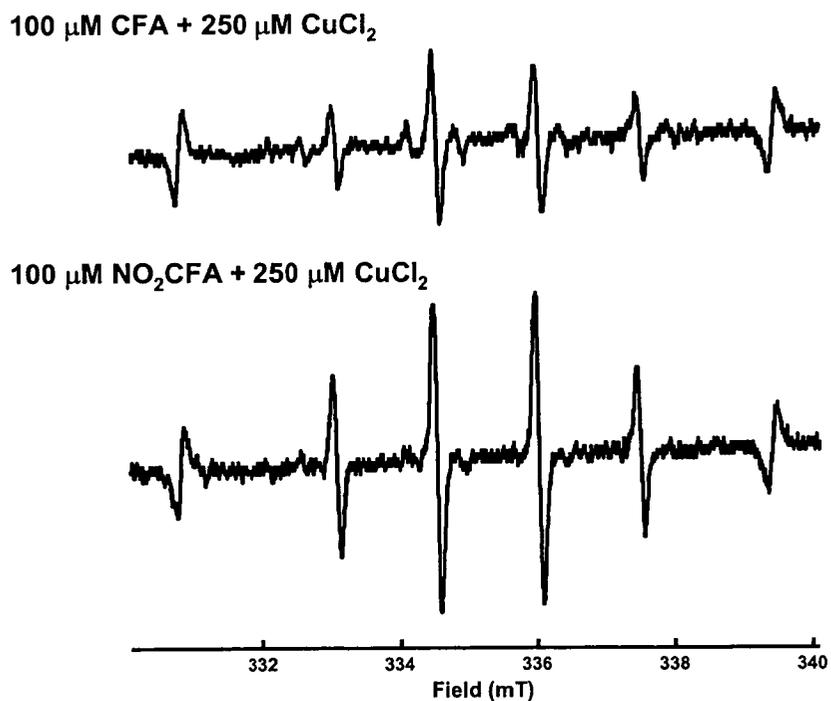


Fig. 6 ESR spectra of hydroxyl radical signal generated during the addition of phenolic compounds and copper

研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト（参考）

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ
	該当なし						

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
	該当なし				